

RUXXA3

Patent Information

RO 78083 B 811130

Application Information

RO 79-97324 790420

BEST AVAILABLE COPY

Abstract

A .gamma.-globulin conc. is obtained from whey, colostrum, or blood serum, by fractional pptn. Thus, 1 L serum is adjusted to an ionic strength of 0.2

with NaCl, followed by the addn. of 80 mL 13% Na polyphosphate, treatment with HCl to pH 4.1-4.3, centrifuging, and adjusting the supernatant to pH

3.5-3.8, to obtain a .gamma.-globulin ppt. The pH of the ppt. is adjusted to 7.4 with NaOH, followed by the addn. of water to a protein content of

10-12%. The .gamma.-globulin prepn. decreased the rate of mortality when injected in newborn piglets.

International Patent Classification

A61K035-14

Document Type

Patent

Language



CONSILIUL NATIONAL
PENTRU
STIINTA SI TEHNOLOGIE

OFICIUL DE STAT
PENTRU
INVENTII SI MARCI

(11) DESCRIEREA INVENȚIEI 78083

(51) Complementară la invenția nr.:

(21) Dosar nr.: 97324

(22) Data înregistrării: 20.04.1979

(30) Prioritate convențională:

(32) Data:

(33) Țara:

(31) Certificat nr.:

(45) Data publicării: 30.11.1981

(51) Int. cl. A 61 K 35/14

(71) Solicitant:

ing. Aureliu Contrea,
Timișoara

(72) Inventator:

ing. Aureliu Contrea,

(73) Titular:

Institutul agronomic,
Timișoara

(54) Procedeu de obținere a unui concentrat gamaglobulinic de uz veterinar

1

Invenția se referă la un procedeu de prelucrare a unor lichide biologice de origine animală (singe, colostru, zer, lichid placentar, homogenate celulare și tisulare etc), în vederea obținerii unui concentrat proteinic în compoziția căruia predomină imunoglobulinele cu rol de anticorpi, alături de metalproteide de tipul transferinelor, utile în tratamentul animalelor tinere afectate de sindromul de deficiență în anticorpi sau de anemie feriprivă.

Este cunoscut procedeu de preparare a gamaglobulinelor prin precipitare fracționată la rece cu alcool prin variația pH-ului și a concentrației în alcool. Acest procedeu necesită instalații frigorifice costisitoare și în faza finală operații de liofilizare industrială ceea ce îl face nerentabil în aplicare pe scară largă în medicina veterinară.

Este cunoscut și procedeu de preparare a gamaglobulinelor prin precipitare cu rivanol. Acest procedeu necesită un reactiv scump și greu accesibil rivanolul, care se prepară prin sinteză complicată sau se importă.

Este cunoscut și procedeu de preparare a gamaglobulinelor prin precipi-

2

tare cu sulfat de amoniu sau alte săruri anorganice. Acest procedeu este dezavantajos prin faptul că durează un timp îndelungat și necesită operații de dializă pentru îndepărtarea sărurilor din soluție, iar sulfatul de amoniu este, de asemenea, un reactiv relativ scump.

Este cunoscută și folosirea polifosfaților pentru separarea proteinelor de origine animală solubile în apă din lichide biologice, dar această tehnică nu separă în mod selectiv gamaglobulinele de albumine și de alte globuline prezente în lichidele biologice.

Procedeu de obținere a concentratului gamaglobulinic, potrivit invenției, înlătură dezavantajele de mai sus, prin aceea că, în scopul obținerii prin operații simple și economice a unui preparat suficient de pur și cu o înaltă activitate imunologică, sînt reținuți cu ajutorul rășinilor cationice din lichidul biologic, ionii de calciu și magneziu, care jonează precipitarea și printr-o potrivire corespunzătoare a tăriei ionice și a pH-ului soluției la valori determinate se asigură o precipitare fracționată selectivă a albuminelor și a unor globuline cu ajutorul unei soluții de

polifosfat de sodiu, iar complexul albumină-polifosfat se separă prin centrifugare.

Se dau mai jos trei exemple de realizare a invenției din singele de porc și din zerul de lapte sau colostru de bovine:

Exemplul 1. Serul sanguin se aduce la o forță ionică de 0,2 prin adăugarea a cîte 2,86 g NaCl pentru fiecare litru de ser. Se adaugă sub agitare în picături 80 ml soluție de polifosfat de sodiu 13% pentru fiecare litru de ser și se acidulează cu HCl N în picături și sub agitare continuă pînă la un pH cuprins între 4,1...4,3 în funcție de puritatea necesară a concentratului și de randamentul în gamaglobulină urmărit. Separarea albuminelor și a alfa și betaglobulinelor de gamaglobuline se realizează în intervalul de pH menționat astfel: la pH=4,25...4,30 precipita albuminele și cu o mică parte din globuline, iar în supernatantul globulinic rămîn ca impurități urme de albumine și alfa și betaglobuline; în schimb la pH=4,10...4,15 precipitatul albuminic este îmbogățit în globuline, iar supernatantul gamaglobulinic este liber de albumine și alte globuline, dar cu un randament mai scăzut, deoarece o parte din gamaglobuline s-au precipitat odată cu albuminele.

În practică se recomandă a se lucra la un pH intermediar (4,15...4,25) în funcție de puritatea și de randamentul dorit. Precipitatul albuminic se centrifughează la 2 500...3 000 rot/min timp de 30...50 min. Supernatantul se separă prin aspirație cu ajutorul vidului, și se adaugă încă 40 ml soluție de polifosfat de sodiu 13% pentru fiecare litru de lichid și se acidulează prin adăugare în picături și sub agitare soluție de HClN pînă la pH=3,5...3,8.

Toate operațiile se efectuează la temperatura laboratorului și sub controlul riguros al pH-ului, fie cu un potențiometrul de precizie (pH=0,02), fie cu ajutorul unui aparat de titrare automată. Se centrifughează din nou suspensia la 2 500...3 000 rot/min timp de 15...30 min.

Supernatantul se aspiră și se aruncă.

Precipitatul gamaglobulinic obținut de la 1 l de lichid se reia cu 60...100 ml apă distilată sterilă și se amestecă bine obținindu-se un omogenizat cărui i se adaugă sub agitare pînă la dizolvarea precipitatului, care are la o valoare a pH-ului de 6...6,5, se adaugă în continuare NaOH N sub con-

trol potențiometric pînă la pH=7,4. După dizolvarea completă a precipitatului care are loc de obicei pînă a doua zi după păstrare la frigider, se readuce pH-ul la 7,4 cu NaOH N.

Se determină proteinele refractometric sau prin altă metodă și se aduce concentrația în proteină totală a concentratului la 10,5% prin diluare cu ser fiziologic steril.

Exemplul 2. Se recoltează singele de la sacrificarea normală a animalelor sau prin puncție venoasă în recipiente clătite cu soluție de mertiolat 1 : 10 000 peste o soluție de citrat de sodiu 5% în raport de un volum soluție de citrat la 9 volume de singe.

Se centrifughează 15 min la 2 500...3 000 rot/min pentru separarea plasmei.

Plasma se prelucrează cum s-a descris în exemplul 1 pentru serul sanguin fără a se mai adăuga NaCl pentru corectarea forței ionice, deoarece are forța ionică corespunzătoare. Randamentul în gamaglobulină este superior în cazul plasmei față de ser, dar necesită o centrifugare în plus.

Exemplul 3. Laptele sau colostrul se centrifughează pentru separarea grăsimii.

Laptele sau colostrul smîntînit se acidulează la pH=4,6 pentru precipitarea caseinei sau se tratează cu renină și se centrifughează pentru separarea caseinei. Zerul se trece printr-o coloană de rășină schimbătoare de ioni cationică în faza Na⁺ pentru reținerea ionilor de Ca²⁺ și Mg²⁺ și se aduce la forță ionică 0,2 prin adăugare de NaCl sau prin diluare după caz, sub control crioscopic, sau conductometric și se adaugă 80 ml soluție de polifosfat de sodiu 13% pentru fiecare litru de zer și se prelucrează cum s-a descris în exemplul 1 pentru serul sanguin. În cazul colostrului concentratul gamaglobulinic obținut este deosebit de bogat în IgA. Administrarea acestuia se poate face, de asemenea, pe cale orală, parenterală sau combinată singur sau în asociație cu gamaglobulinele sanguine.

Concentratul gamaglobulinic obținut prin procentul potrivit invenției din singele porcilor sacrificați normal și administrat la purcei în primele ore sau cel mai tîrziu la o zi după naștere, au dus la reducerea mortalității neonatale (pînă la vîrsta de 14 zile) în funcție de cale de administrare, comparativ cu pîndările din loturile martor, după cum se vede în tabelul următor:

| Calea de administrare a concentratului gamaglobulinic | Lot experimental | | | Lot martor | | |
|---|------------------|-----------------------|-------|------------|-----------------------|-------|
| | Nr. purcei | Pierderi înregistrate | | Nr. purcei | Pierderi înregistrate | |
| | | Nr. | % | | Nr. | % |
| Administrare per os 5 ml | 369 | 40 | 10,84 | 363 | 44 | 12,12 |
| Administrare subcutan 5 ml | 453 | 58 | 12,80 | 436 | 67 | 15,36 |
| Administrare combinată 3 ml per os și 2 ml subcutan | 233 | 29 | 12,44 | 237 | 61 | 25,73 |
| Total general | 1 055 | 127 | 12,03 | 1 036 | 172 | 16,60 |

Reducerea mortalității neonatale la purcei (pină la vîrsta de 14 zile) prin administrare de concentrat gamaglobulinic pe diverse căi, comparativ cu pierderile la loturile martor.

Aplicarea invenției aduce următoarele avantaje:

— se reduc mortalitățile și îmbolnăvirile tineretului animal cu 10...26% în funcție de modul de administrare și de situația epizotologică a unității;

— se utilizează drept materie primă, atît singele provenit din sacrificările normale, sau prin recoltări de la animalele adulte imunizate sau chiar neimunizate din cadrul aceluiași unități de creștere în care se administrează concentratul în scop curativ sau profilactic la tineret, ceea ce asigură prezența în concentrat a anticorpilor specifici bolilor infecțioase din zona respectivă, cît și zerul de lapte sau colostru;

— tehnologia de preparare a concentratului gamaglobulinic este simplă și economică întrucît necesită un număr restrîns de operații (precipitare fracționată sub control pH-metric, centrifugare, trecere peste coloană de schimbători de ioni etc.) și nu necesită temperaturi scăzute de lucru cum este cazul metodelor bazate pe precipitare fracționată cu alcool;

— utilizează substanțe ieftine și accesibile;

— concentratul poate fi administrat direct per os sau parenteral fără a fi necesară reținerea polifosfatului rezidual.

Revendicare

Procedeu de obținere a unui concentrat gamaglobulinic de uz veterinar, caracterizat prin aceea că se obține prin tratarea serului sau plasmei sanguine sau a zerului de lapte sau colostru adus în prealabil la forța ionică 0,2 cu sau fără trecerea peste rășini cationice cu o soluție de polifosfat de sodiu 12...13% și acidularea cu HCl pină la pH=4,10...4,30, iar după separarea precipitatului albuminic prin centrifugare se continuă acidularea cu HCl pină la pH=3,5...3,8 urmat de centrifugarea și reluarea precipitatului gamaglobulinic cu apă distilată și neutralizarea terciului obținut cu NaOH pină la pH=7,4 și diluare cu apă distilată pină la o concentrație în proteină totală de 10...12%.

(56) Referințe bibliografice

Brevete, S.U.A., nr. 2377624 ; 2726235
Brevet, Canada, nr. 790580

Președinte comisie invenții : **chim. Georgeta Tenea**

Examinator : **farm. Aurica Corăci**